

ВІДГУК
ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу

Коломієць Лесі Анатоліївни

«Створення та характеристика нанокмпозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ з декстраном 70» представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 00.03.20 – біотехнологія

Ендотеліальний та моноцитаактивуючий поліпептид ІІ (ЕМАР ІІ) є продуктом протеолітичного розщеплення мультифункціонального білка р43, що входить до складу аміноацил-тРНК синтетазного комплексу вищих еукаріотів. Дослідження показали, що ЕМАР ІІ має антитипухлинні та протизапальні активності. Роль ЕМАР ІІ пов'язана з патологічними процесами, в першу чергу, з гострою імунною відповіддю і онкогенезом. У зв'язку з цим в ряді країн ведуться масштабні експериментальні дослідження біологічних властивостей ЕМАР ІІ.

Використання білків та білкових препаратів широко застосовується у медичній практиці при лікуванні різноманітних захворювань. Як відомо, онкологічні захворювання посідають друге місце серед смертності людей у всьому світі. Тому сучасна медицина направлена на пошук та створення нових потенційних протипухлинних препаратів. Одним із перспективних цитокінів є ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид ІІ – ЕМАР ІІ, який ще не використовується в практиці, оскільки відсутня налагодженої методики отримання цього цитокіна в препаративних кількостях як нового біотехнологічного продукту, а також здатність білка до агрегації. Тому для подолання цієї проблеми в фармакології використовують додаткові хімічні речовини здатні знизити рівень агрегації білка, підвищити стійкість до протеолітичних ферментів крові та шлунково-кишкового тракту, а також збільшити розчинність. Автор обрала як ліганд для створення комплексу з білком ЕМАР ІІ декстран. В літературних джерелах все частіше

зустрічаються експериментальні дослідження з використанням декстранів для стабілізації білків.

Тема дисертаційної роботи, присвячена біотехнологічній розробці комплексу EMAP II з декстраном 70 є **актуальною** як у фундаментальному так і прикладному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та досліджень кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою, містить 22 рисунки, 5 таблиць та 2 додатки. Список використаних джерел містить 213 посилань і містить роботи останніх років. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в 23 наукових працях, що включають 8 статей в фахових наукових журналах та 2 патенти на корисні моделі. Серед них 2 статті, що входять до наукометричної бази Scopus, одна з якої в журналі II квартилю.

В розділі I дисертаційної роботи Леся Анатоліївна проаналізувала велику кількість сучасних наукових літературних даних, присвячених актуальності проведення своїх досліджень. Вона досить повно описала канонічні і неканонічні функції білка EMAP II, висвітлила проблему агрегації білків та способам подолання цієї проблеми.

В II розділі «Матеріали і методи» автор описала сучасні молекулярно-біотехнологічні методи досліджень, які використовувала для своїх досліджень (бактеріальна експресія рекомбінантних білків, афінна хроматографія на Ni-NTA агарозі, електрофоретичні дослідження, спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія, робота з культурами

клітин, лазерна кореляційна спектрометрія, робота з тваринами, визначення ендотоксинів методом гель-тромб тесту (LAL-тест), отримання ксенографтів пухлин, методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки, статистичний аналіз та ін.)

В III розділі «Результати експериментальних досліджень» представлені результати численних експериментальних досліджень, які демонструють високий вихід білка ЕМАР II при оптимізації експресії цього цитокіна в бактеріальній системі *E.coli*. Також методами флуоресцентної спектроскопії та динамічного світорозсіювання автор показала утворення комплексу ЕМАР II з декстраном 70 та роль декстрану 70 при утворенні вказаного комплексу. Леся Анатоліївна в своїх дослідженнях показала важливість створення комплексу та продемонструвала властивості створеного комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Зокрема, здатність впливати на продукцію фактора некрозу пухлин та інтерферону на культурі клітин, впливу комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на проліферацію та апоптоз у культурі клітин, показано протипухлинну активність комплексу на моделі трансплантованих ксенографтів аденокарциноми простати людини під капсулу нирки у мишей, проведено дослідження на пірогенність нанокмпозитного комплексу та можливий токсичний вплив комплексу на організм мишей. Крім цього, автор представила результати біоінформатичних досліджень, що показують можливі шляхи утворення агрегатів між молекулами ЕМАР II, а також участь в цьому процесі декстрану 70. Варто відмітити, що комп'ютерні методи досліджень гарно корелюють з експериментальними методами. Поєднання експериментальних та біоінформатичних методів є досить сучасним та позитивно характеризує роботу. Статистична обробка результатів проведена на належному рівні і не викликає сумнівів.

В IV розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» Леся Анатоліївна провела детальний аналіз власних отриманих результатів експериментальних досліджень і порівняла їх з результатами, що

опубліковані іншими дослідниками. На основі власних досліджень та наявних у літературі даних автор запропонувала гіпотезу утворення агрегатів між молекулами ЕМАР ІІ, яка полягає у ролі неструктурованої петлі однієї молекули білка, яка блокує гідрофобну триптофанову «кишеню» іншої молекули ЕМАР ІІ, утворюючи таким чином агрегати. Також запропоновано спосіб зниження агрегації цитокіна шляхом створення нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 та показано методом біоінформатичного аналізу, що з декстраном 70 зв'язуються такі амінокислотні залишки Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166.

Підсумовуючи вище сказане, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Л.А.Коломієць полягає в тому, що створено новий біотехнологічний продукт, а саме, нанокмпозитний комплекс ендотеліального моноцитакивуючого поліпептида ІІ (ЕМАР ІІ) з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінатного білка ЕМАР ІІ в бактеріальній системі експресії. Показано стабілізацію білка ЕМАР ІІ у комплексі з декстраном 70. Запропонований можливий механізм агрегації цитокіна ЕМАР ІІ та механізм її запобігання. Таким чином, представлені у дисертаційній роботі дані поглиблюють уявлення про механізми утворення білкових агрегатів та способи їх запобігання. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть своє застосування, перш за все у наукових дослідженнях в галузях біотехнології, молекулярної біології та медицині, а також у практичних розробках, що проводяться у різних установах, де вивчають стабільність білків. Також важливо відмітити і можливість проведення доклінічних та клінічних досліджень створеного нанокмпозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ з декстраном 70 як потенційного протипухлинного комплексу.

Висновки, зроблені Лесею Анатоліївною, чіткі та повністю відповідають меті та поставленим завданням.

Принципових зауважень як до оформлення, так і до викладення результатів немає. Присутні незначні недоліки в тексті, невдалі фразеологізми та орфографічні помилки, які не шкодять позитивному враженню від роботи Лесі Анатоліївни і можуть бути виправлені. Є кілька запитань до автора:

1. Чи пробували Ви створювати комплекси ЕМАР II з іншими лігандами?
2. Чи є у Вашому розумінні різниця в поняттях «рекомбінантний білок ЕМАР» II та просто ЕМАР II?
3. Чи проводили Ви патентний пошук по наявності патентів з використанням ЕМАР II?
4. Яким чином вимірювали чистоту білка ЕМАР II?

Висновок щодо відповідності вимогам, встановлених для кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Коломієць Лесі Анатоліївни «Створення та характеристика нанокмпозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70» є цілісною завершеною науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а Леся Анатоліївна Коломієць заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 00.03.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

завідувач лабораторією імунобіології

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

доктор біологічних наук, професор



Д.В. Колибо